

Η συνεχής ανάπτυξη στους τομείς των ερευνητικών μετρήσεων παρέχει στους επιστήμονες όλο και περισσότερα δεδομένα σχετικά με τα μυστήρια της λειτουργίας των βιολογικών συστημάτων. Μόλις πριν από μισό αιώνα, οι άνθρωποι δεν γνώριζαν καν πως επιτυγχάνεται η βιοποικιλότητα που παρατηρούμε στον κόσμο, ενώ δεν ήταν και ακριβώς γνωστή η διαδικασία με την οποία οι οργανισμοί κληρονομούν χαρακτηριστικά από τους γεννήτορές τους. Σήμερα, αν και γνωρίζουμε πολύ περισσότερα, πολλά μυστήρια παραμένουν άλυτα και απαιτείται συνεχής έρευνα. Οι ερευνητικές μετρήσεις αφορούν, όπως έχουμε ήδη αναφέρει παραπάνω, κυρίως την μέτρηση τεσσάρων πολύ βασικών βιολογικών ουσιών.

Κατ' αρχήν, η μέτρηση του DNA υπήρξε ένας βασικός στόχος τις τελευταίες δεκαετίες. Από το 1970 έχει αρχίσει η καταγραφή του DNA διαφόρων φυτών και ζώων, ενώ πολύ πρόσφατα ολοκληρώθηκε η αποκρυπτογράφηση του ανθρώπινου DNA. Η γνώση ολόκληρου του DNA, ή διαφόρων τμημάτων αυτού, έχει πολύ μεγάλη σημασία. Με τη γνώση αυτή μπορεί να γίνει πρόβλεψη για διάφορες ασθένειες ή γενετικές ανωμαλίες. Επίσης μπορούν να ταυτοποιηθούν άτομα με βάση το γενετικό υλικό τους, κ.λπ. Τα οφέλη της εύκολης αποκρυπτογράφησης του DNA ενός οργανισμού είναι πολλά και προφανή, αλλά εγείρονται επίσης ερωτήματα ηθικής φύσης, αφού η γνώση αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί και με όχι και τόσο αγαθούς σκοπούς.

Η γνώση του DNA είναι πολύ σημαντική, αλλά είναι σε μεγάλο βαθμό άχρηστη αν κανείς δεν μπορεί να μετρήσει τις παραγόμενες πρωτεΐνες. Όπως είδαμε και σε παραπάνω κεφάλαιο, η παρουσία των πρωτεϊνών δημιουργεί όλη την πληθώρα των μορφών, δομών και λειτουργιών σε κάθε οργανισμό. Έτσι, οι γνώσεις γύρω από τους μηχανισμούς παραγωγής, αλλά και η γνώση της δράσης της κάθε πρωτεΐνης είναι κρίσιμης σημασίας. Μια τέτοια γνώση, αν και μπορεί να επιτευχθεί πάρα πολύ δύσκολα, θα έδινε απαντήσεις σε πολλά ερωτήματα γύρω από τις βιολογικές λειτουργίες και θα μπορούσε να προσφέρει θεραπεία σε πολλές ασθένειες. Για τους παραπάνω λόγους σκοπός των βιολογικών μετρήσεων είναι να μετρήσουν την παραγωγή, καταστολή ή μετάλλαξη διαφόρων πρωτεϊνών υπό ποικίλα ερεθίσματα.

Πέρα από το DNA και τις πρωτεΐνες, οι ερευνητικές μετρήσεις στοχεύουν και στη μέτρηση άλλων ουσιών, όπως οι ουσίες που συμμετέχουν στο μεταβολισμό (μεταβολήτες), αλλά και ουσίες που συμμετέχουν στην έκφραση του DNA (RNA). Οι ουσίες αυτές έχουν επίσης μεγάλη σημασία στην λειτουργία ενός οργανισμού, αλλά σχετίζονται και καθορίζονται σε μεγάλο βαθμό από το DNA ή τις πρωτεΐνες που συμμετέχουν στις αντίστοιχες διαδικασίες. Έτσι παρακάτω θα εστιάσουμε την ανάλυσή μας στις μετρήσεις του DNA και των πρωτεϊνών ως μια πρώτη εισαγωγή και παρουσίαση των μεθόδων μέτρησης, αλλά και της σημασίας των μετρήσεων αυτών στις μέρες μας.^[5,1]

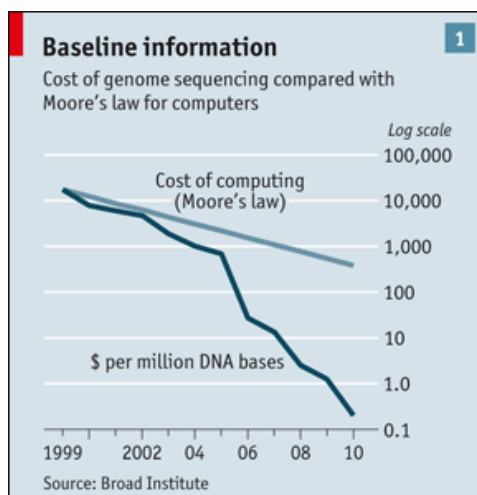
5.1 Μετρήσεις DNA

Η μέτρηση του DNA έχει, όπως αναφέραμε, πολύ μεγάλη σημασία και αποκτά όλο και μεγαλύτερη. Οι επιστήμονες ελπίζουν ότι σύντομα θα κατανοήσουμε τα μυστήρια της ζωής που παραμένουν κρυφά και θα μπορέσουμε να έχουμε συγκεκριμένη περιθαλψη για το κάθε άτομο ξεχωριστά, βασισμένη στο γενότυπό του. Σε κάθε περίπτωση, οι τεχνικές μέτρησης του DNA εξελίσσονται συνεχώς και με ταχύτατους ρυθμούς, ενώ χρηματοδοτούνται και από σημαντικούς παγκόσμιους φορείς.

Μεγάλη ώθηση στην αποκρυπτογράφηση του ανθρώπινου DNA έδωσε ένα σχέδιο για μια παγκόσμια ερευνητική προσπάθεια που ονομάστηκε “Human Genome Project (HGP)” και ξεκίνησε τον Οκτώβριο του 1990. Η προσπάθεια αυτή, που κράτησε μέχρι το 2003, κόστισε 3 δισεκατομμύρια δολάρια και είχε σαν αποτέλεσμα την πρώτη πλήρη χαρτογράφηση ενός ανθρώπινου DNA.

Από το σημείο αυτό και έπειτα, η εξέλιξη στις μετρήσεις DNA ήταν ραγδαία. Σήμερα, οι ερευνητές μπορούν να αποκρυπτογραφήσουν το γονότυπο ενός ανθρώπου μέσα σε λίγες μέρες και με κόστος μερικές εκατοντάδες δολάρια. Αντίστοιχα, στο σύντομο μέλλον, αναμένεται η αποκρυπτογράφηση του DNA να είναι δυνατή σε μερικά λεπτά και με κόστος μόλις μερικές δεκάδες δολάρια. Έτσι, η εξέλιξη της τεχνολογίας αναμένεται να κάνει προσιτή στο ευρύ κοινό τη γνώση που πριν ήταν αδύνατο να προσεγγιστεί.

Στην παρακάτω εικόνα βλέπουμε μια αντίστοιχη προσπάθεια να συγκριθεί το κόστος των ηλεκτρονικών συστημάτων υπολογισμού, που ακολουθεί το νόμο του Moore (Moore’s law), με το κόστος της χαρτογράφησης του ανθρώπινου DNA.



Εικόνα 5.1: Νόμος μείωσης του κόστους χαρτογράφησης του ανθρώπινου DNA^[5,2]

Καθώς οι επιστήμονες αποκτούν όλο και μεγαλύτερες προσδοκίες από τον προσδιορισμό θεραπειών που θα βασίζονται σε συγκεκριμένα γονίδια, η χρηματοδότηση πάνω σε όλο και ταχύτερες μεθόδους αποκρυπτογράφησης αυξάνει ραγδαία. Χαρακτηριστικό τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η θέσπιση ενός βραβείου με το όνομα “X Prize”. Το έπαθλο του βραβείου αυτού είναι 10 εκατομμύρια δολάρια, ενώ ο σκοπός που πρέπει να επιτευχθεί είναι η πλήρης χαρτογράφηση του DNA εκατό αιωνόβιων ανθρώπων, δηλαδή εκατό ανθρώπων άνω των εκατό ετών (100 over 100). Τα αποτελέσματα πρέπει να αποδοθούν γρήγορα, με ακρίβεια και οικονομικά, ενώ απώτερος σκοπός είναι να προσεγγιστούν τα γονίδια αυτά που πιθανώς μπορεί να χαρίζουν μακροζωία.^[5,3]

Παρόμοια βραβεία θεσπίζονται από διάφορους φορείς, ενώ μόλις επιτευχθεί ένας στόχος, ορίζεται ένας νέος. Με τον τρόπο αυτό, δίνεται κίνητρο και κατευθυντήρια γραμμή στους ερευνητές και επιταχύνεται σε μεγάλο βαθμό η εξέλιξη των αντίστοιχων πεδίων. Στη συνέχεια θα εξετάσουμε συνοπτικά διάφορες μεθόδους μέτρησης DNA που αναπτύχθηκαν και εξελίχθηκαν μέσα από τέτοιες διαδικασίες.

Μέθοδοι μέτρησης

Παρατηρούμε ότι οι μέθοδοι μέτρησης DNA χωρίζονται σε μαζικές (high-throughput sequencing) και μη μαζικές. Οι μη μαζικές ήταν οι πρώτες μέθοδοι που αναπτύχθηκαν και ήταν πολύ αργές. Σήμερα οι μη μαζικές μέθοδοι τείνουν να αντικατασταθούν ή πραγματοποιούνται μόνο σε συνδυασμό με μαζικές μεθόδους.

Αρχικά θα εξετάσουμε τις μη μαζικές μεθόδους. Από αυτές, η πιο σημαντική είναι η μέθοδος του Sanger ή μέθοδος τερματισμού αλυσίδας (chain termination method). Η μέθοδος αυτή κυριάρχησε στο χώρο της χαρτογράφησης του DNA για περισσότερα από 30 χρόνια, ενώ χρησιμοποιείται και σήμερα, σε μεγάλο βαθμό σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους.

➤ Μέθοδος Maxam-Gilbert.

Την περίοδο 1976-1977 οι ερευνητές Allan Maxam και Walter Gilbert προχώρησαν σε μια σειρά από δημοσιεύσεις γύρω από μια μέθοδο που υποσχόταν την πλήρη χαρτογράφηση του ανθρώπινου DNA. Η μέθοδος αυτή ονομάστηκε Maxam-Gilbert και βασίστηκε σε μεγάλο βαθμό σε μια δημοσίευση που είχε κάνει ένας άλλος ερευνητής, ο Frederick Sanger, δύο χρόνια νωρίτερα.

Η μέθοδος που περιέγραψαν οι δύο αυτοί ερευνητές έγινε γρήγορα αποδεκτή και την υιοθέτησαν πολλοί άλλοι ερευνητές, αφού ήταν ευκολότερη και υποσχόταν μεγάλη ακρίβεια αποτελεσμάτων σε σχέση με ότι είχε προταθεί παλαιότερα. Παρά την αρχική της επιτυχία και αυτή η μέθοδος παραγκωνίστηκε στη συνέχεια από μια νέα μέθοδο που δημοσίευσε ο Sanger λίγα χρόνια αργότερα. Σε σύγκριση με την νέα μέθοδο, η μέθοδος Maxam-Gilbert ήταν υπερβολικά πολύπλοκη για ένα μέσο ερευνητικό εργαστήριο, ενώ χρησιμοποιούσε και ιδιαίτερα επικίνδυνα ραδιενεργά υλικά.

Η μέθοδος Maxam-Gilbert βασίζεται στον χημικό μετασχηματισμό του DNA και τη δημιουργία οπών στην αλυσίδα του. Οι οπές που δημιουργούνται αντιστοιχούν σε συγκεκριμένη βάση (αδενίνη A, γουανίνη G, θυμίνη T, κυτοσίνη C). Μετρώντας στη συνέχεια τις οπές που δημιουργούνται γίνεται η καταγραφή της ακολουθίας των βάσεων στην αλυσίδα του DNA. Για να πραγματοποιηθούν οι παραπάνω διαδικασίες απαιτείται η χρήση ραδιενεργών στοιχείων και ισχυρών χημικών ουσιών.

Η μέθοδος τερματισμού αλυσίδας (chain termination method) ή μέθοδος Sanger μοιάζει στην αρχή λειτουργίας της με την μέθοδο Maxam-Gilbert, αλλά χρησιμοποιεί ραδιενεργά υλικά σε μικρότερο βαθμό και πιο ήπιες χημικές ουσίες. Για τους παραπάνω λόγους αλλά και για την ακρίβεια που προσφέρει και την δυνατότητα αυτοματοποίησης της, κατέκτησε τα ερευνητικά εργαστήρια για πολλά χρόνια.

Το αρχικό δείγμα DNA μετά από επεξεργασία γίνεται μονόκλωνο και αναπαράγεται τρεις φορές, έτσι ώστε να έχουμε τέσσερα δείγματα ταυτοτικά του αρχικού. Στο κάθε ένα από τα τέσσερα δείγματα προστίθεται και μια διαφορετική ουσία τερματισμού. Έτσι η κάθε αλυσίδα χωρίζεται σε πολλά μικρά τμήματα διαφορετικού μήκους. Στη συνέχεια, με χημικές μεθόδους τα τμήματα αυτά τοποθετούνται και πάλι στη σωστή σειρά, ενώ στα σημεία της ένωσης εμφανίζονται κενά. Τοποθετώντας τις τέσσερις κομμένες και ξαναενωμένες αλυσίδες DNA τη μια δίπλα στην άλλη και κάνοντας με κάποια μέθοδο τις ενώσεις να εμφανιστούν, διαβάζουμε την ακολουθία των βάσεων στο DNA.

➤ T-A-C-G-G-G-A-T-C-A-A-A-G-C-T-T-A

[illegible]

[92]

➤ Μέθοδος ενίσχυσης και επιλογής.

Η μέθοδος της ενίσχυσης και επιλογής (amplification and clonal selection method) χρησιμοποιείται κυρίως για την χαρτογράφηση μεγάλων ακολουθιών DNA ή και ολόκληρων χρωμοσωμάτων. Στη μέθοδο αυτή, που έχει πολλές παραλλαγές, η μακριά αλυσίδα DNA χωρίζεται σε πολύ μικρά δείγματα τα οποία αφού κλωνοποιηθούν με ειδικές διαδικασίες τοποθετούνται μέσα σε βακτήρια. Το βακτήριο που χρησιμοποιείται συνήθως είναι το *Escherichia coli*. Με τον ταχύτατο πολλαπλασιασμό των βακτηρίων δημιουργούνται πολύ γρήγορα και αντίστοιχα αντίγραφα των δειγμάτων DNA.

Στη συνέχεια, οι αλυσίδες DNA που αποτελούν το δείγμα απομονώνονται από τα βακτήρια και ενώνονται ξανά με χρήση ηλεκτρονικών μέσων. Τυχών κενά στην αλληλουχία των βάσεων που προκύπτουν από τη διαδικασία αυτή θεωρείται ότι καλύπτονται από την μεγάλη ποσότητα του ενισχυμένου πλέον δείγματος.

Γενικά υπάρχουν πολλές παραλλαγές της μεθόδου αυτής. Κάποιες θεωρείται ότι προσφέρουν μεγάλη ταχύτητα αλλά με μειωμένη αξιοπιστία, ενώ άλλες είναι πιο αργές αλλά θεωρούνται πιο ακριβείς.

➤ Μαζικές μέθοδοι.

Οι μαζικές μέθοδοι, ή αλλιώς μέθοδοι νέας γενιάς (high-throughput sequencing or next generation sequencing) διαφέρουν από τις παλαιότερες μεθόδους, αφού μπορούν να επεξεργάζονται παράλληλα χιλιάδες ή και εκατομμύρια ακολουθίες βάσεων DNA. Μια άλλη ονομασία που δίνεται συχνά στις μεθόδους αυτές είναι τεχνολογίες μαζικά παράλληλης ακολουθίας (massively parallel sequencing technologies).

Η μέχρι πρότινος ευρεία χρήση της μεθόδου Sanger είχε σαν συνέπεια την εξέλιξη της και χρήση της σε πολλούς διαφορετικούς τομείς της χημείας και της βιολογίας και σε εφαρμογές διαφορετικής κλίμακας και ενδιαφέροντος. Παρ' όλα αυτά η μέθοδος αυτή φαίνεται να έχει αγγίξει τα όρια της. Όσο και αν υπάρχει περιθώριο για μικρές βελτιώσεις, η μέθοδος αυτή δεν αναμένεται να μπορεί να αυξήσει σημαντικά την ταχύτητα, ούτε να μειώσει το κόστος της χαρτογράφησης δειγμάτων DNA. Αντίθετα οι νέες μαζικές μέθοδοι αναμένεται να μπορέσουν να μειώσουν το κόστος και να αγγίξουν τον στόχο της αποκρυπτογράφησης του DNA ενός ατόμου, σε μια ημέρα και με κόστος κάτω από χίλια δολάρια.

Η μείωση του κόστους και αύξηση της ταχύτητας παραγωγής αποτελεσμάτων γίνεται δυνατή χάρη σε δύο κύριους παράγοντες. Πρώτον, είναι πλέον δυνατή η παράλληλη επεξεργασία πολλών χιλιάδων ή εκατομμυρίων ακολουθιών βάσεων. Δεύτερον, η κλωνοποίηση ή και ενίσχυση του δείγματος δεν είναι πλέον απαραίτητη, αλλά ακόμα και στις περιπτώσεις που είναι απαραίτητη γίνεται πλήρως αυτοματοποιημένα από την ίδια συσκευή που πραγματοποιεί την ανάλυση.

Ένα άλλο σημαντικό πλεονέκτημα των μεθόδων αυτών είναι ότι είναι πιο εύκολο να εντοπιστούν μικρές αλλαγές στο DNA των δειγμάτων. Έτσι είναι δυνατό να εντοπιστούν μεταλλάξεις που στις παλαιότερες μεθόδους θα περνούσαν απαρατήρητες.

Σύμφωνα με τα παραπάνω και αν λάβουμε υπόψη ότι το διάστημα 2006-2008 δημοσιεύθηκαν πάνω από 100 ερευνητικά άρθρα πάνω στις μεθόδους αυτές, αντιλαμβανόμαστε τη δυναμική τους και τις δυνατότητες εξέλιξης. Στο μέλλον οι μέθοδοι αυτές αναμένεται να κυριαρχήσουν πλήρως στην χαρτογράφηση του DNA.

Στη συνέχεια θα εξετάσουμε συνοπτικά μερικές μεθόδους που εντάσσονται στις μαζικές μεθόδους και αντιπροσωπεύουν διαφορετικές τεχνολογίες. Οι μέθοδοι αυτές παρουσιάζουν διαφορετικά πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα που τις κάνουν πιο κατάλληλες για διαφορετικές εφαρμογές.^[5.1]

- Lynx Therapeutics' Massively Parallel Signature Sequencing (MPSS)

Η πρώτη από τις τεχνολογίες νέας γενιάς, δημιουργήθηκε τη δεκαετία του 1990 από την εταιρία Lynx Therapeutics, η οποία ιδρύθηκε το 1992. Η μέθοδος αυτή βασίστηκε στην τεχνολογία των μικροσφαιριδίων αλλά ήταν τόσο πολύπλοκη που χρησιμοποιήθηκε αποκλειστικά από την κατασκευάστρια εταιρία για τις δικές της έρευνες. Μετά την ανάδειξη νέων μεθόδων γρήγορα εγκαταλείφθηκε, ενώ και η ίδια η Lynx Therapeutics απορροφήθηκε από ανταγωνιστικές εταιρίες.

- Polony sequencing

Η μέθοδος αυτή, που είναι επίσης μια από τις πρώτες μαζικές μεθόδους, αναπτύχθηκε στα εργαστήρια του Harvard από τον ερευνητή George Church. Ήταν μια από τις μαζικές μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν το 2005 για να αποκρυπτογραφήσουν πλήρως ένα γονίδιο του βακτηρίου E. coli με ακρίβεια μεγαλύτερη από 99.99% και κόστος στο 1/10 του κόστους αντίστοιχης μεθόδου Sanger. Η τεχνολογία αυτή εξαγοράστηκε από την εταιρία Life Technologies και ενσωματώθηκε σε μια νέα μέθοδο που αναπτύχθηκε, την SOLiD.

- 454 pyrosequencing

Η μέθοδος αυτή αναπτύχθηκε από την 454 Life Sciences και στη συνέχεια εξαγοράστηκε και ανήκει στην Roch Diagnostics. Σε αυτή τη μέθοδο το DNA παγιδεύεται μέσα σε σταγόνες νερού σε μάζα ελαίου και στη συνέχεια γίνεται ανάγνωσή του χρησιμοποιώντας την παραγωγή φωτός από ανόργανα μόρια φωσφόρου. Το κόστος της μεθόδου αυτής είναι χαμηλότερο από αυτό της μεθόδου Sanger αλλά υψηλότερο σε σχέση με άλλες μαζικές μεθόδους, ενώ η ακρίβειά της αγγίζει το 99.5%.

- Illumina (Solexa) sequencing

Η μέθοδος αυτή αναπτύχθηκε αρχικά από την εταιρία Solexa που είναι πλέον μέρος της Illumina. Η μέθοδος αυτή μοιάζει σε μεγάλο με την μέθοδο Sanger μόνο που εκτελείται παράλληλα και η ανάγνωση των βάσεων γίνεται με οπτική καταγραφή και χρήση φθορίζοντων (fluorescent) ουσιών. Η μέθοδος αυτή είναι ιδιαίτερα οικονομική και προσφέρει ακρίβεια μεγαλύτερη του 99.5%.

- SOLiD sequencing

Η μέθοδος αυτή, όπως είδαμε ανήκει στην εταιρία Life Technologies και είναι λίγο διαφορετική από τις άλλες μεθόδους. Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται και οι δύο αλυσίδες του DNA και για το λόγο αυτό λάθη στην ανάγνωση του ενός κλώνου μπορούν να διορθωθούν κατά την ανάγνωση του άλλου. Έτσι η ακρίβεια της μεθόδου αυτής αγγίζει το 99.94%, ενώ το κόστος της είναι ιδιαίτερα χαμηλό και εφάμιλλο του κόστους της μεθόδου της εταιρίας Illumina. Όπως και η μέθοδος της Illumina, και η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί φθορίζουσες ουσίες και μικροσφαιρίδια.

– Ion semiconductor sequencing

Η μέθοδος αυτή ανήκει επίσης στην εταιρία Life Technologies. Αντί για τις οπτικές μεθόδους ανίχνευσης των βάσεων του DNA, στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιείται ένας υπερευαίσθητος ημιαγωγός. Ο ημιαγωγός αυτός ανιχνεύει την έκλυση ενός ιόντος υδρογόνου κατά τον πολυμερισμό του μονόκλωνου DNA και έτσι καταγράφεται η ακολουθία των βάσεων. Το κόστος της μεθόδου αυτής είναι ελαφρώς υψηλότερο από αυτό των προηγούμενων δύο μεθόδων.

– DNA nanoball sequencing

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται γενικά για την αποκρυπτογράφηση ολόκληρου του γονιδιώματος ενός οργανισμού. Στη μέθοδο αυτή, που αναπτύχθηκε από την εταιρία Complete Genomics, το γονιδίωμα χωρίζεται σε πολύ μικρά κομμάτια με διαστάσεις της τάξης του νανόμετρου. Αφού τα κομμάτια αυτά αποκωδικοποιηθούν, στη συνέχεια επανασυναρμολογούνται για να διαβαστεί το συνολικό γονιδίωμα. Λόγω της διαδικασίας αυτής είναι γενικά δύσκολο να επιτευχθεί υψηλή ακρίβεια από τη μέθοδο αυτή.

– Helioscope(TM) single molecule sequencing

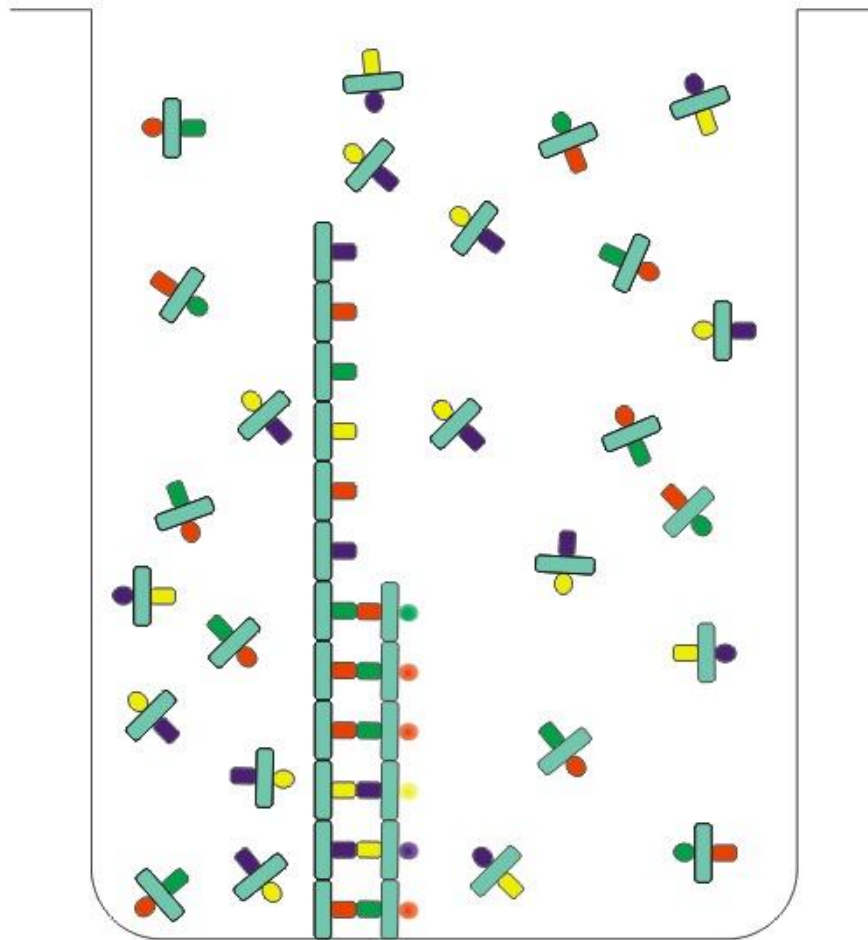
Η μέθοδος αυτή ανιχνεύει την ακολουθία των βάσεων ενός μορίου DNA χωρίς να πραγματοποιεί κάποια ενίσχυση ή πολλαπλασιασμό του δείγματος. Η μέθοδος αυτή βασίζει τη μεθοδολογία της στη μέθοδο Sanger και χρησιμοποιεί ισχυρά μικροσκόπια και φθορίζουσες ουσίες για την καταγραφή της διαδοχής των βάσεων στην αλυσίδα του DNA. Η ακρίβεια της μεθόδου αγγίζει το 99%.

– Nanopore DNA sequencing

Η μέθοδος αυτή αναπτύσσεται από την εταιρία Oxford Nanopore Technologies και βρίσκεται ακόμα σε πειραματικό στάδιο. Η τεχνολογία αυτή βασίζεται στις ηλεκτρικές ιδιότητες του DNA. Όταν εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο κατά μήκος ενός πόρου μερικών νανόμετρων, παράγεται ρεύμα στην περιφέρειά του. Καθώς ένα μόριο DNA περνά μέσα από τον πόρο, κάθε βάση αλλάζει με διαφορετικό τρόπο την ένταση του ρεύματος. Με την μέτρηση των μεταβολών του ηλεκτρικού ρεύματος προκύπτει η αλληλουχία των βάσεων του μορίου.

– Single molecule SMRT(TM) sequencing

Η μέθοδος αυτή έχει αναπτυχθεί από την Pacific Biosciences και βρίσκεται ακόμα σε ερευνητικό στάδιο. Στη μέθοδο αυτή η ακολουθία των βάσεων αναγνωρίζεται με σύνθεση ενός μονόκλωνου μορίου DNA. Το δείγμα του μονόκλωνου DNA τοποθετείται στη βάση ενός μικροσκοπικού πηγαδιού, το οποίο γεμίζει με διάλυμα διαφόρων νουκλεοτιδίων. Κάθε νουκλεοτίδιο, ανάλογα με τη βάση που φέρει, συνδέεται και με μια φθορίζουσα ουσία διαφορετικού χρώματος. Καθώς τα ελεύθερα νουκλεοτίδια συνδέονται στο δείγμα του μονόκλωνου DNA, η συσκευή ανίχνευσης ρίχνει επάνω τους φως και καταγράφει το χρώμα τους. Έτσι καταγράφεται η αλληλουχία των βάσεων του δείγματος. Στο παρακάτω σχήμα βλέπουμε μια απλοποιημένη εκδοχή αυτής της μεθόδου.



Εικόνα 5.3: Μέθοδος SMRT

Γενικά παρατηρούμε ότι υπάρχουν πολλές και διαφορετικές μεταξύ τους μαζικές μέθοδοι. Ακόμα περισσότερες μέθοδοι βρίσκονται σε στάδιο σχεδιασμού και δεν υπάρχουν καθόλου δεδομένα για την αποτελεσματικότητα και το κόστος τους. Στην φάση αυτή είναι λοιπόν δύσκολο να προβλέψει κανείς ποια μέθοδος θα επικρατήσει των υπολοίπων και θα κατακτήσει τους ερευνητές. Σε κάθε περίπτωση πάντως είναι εμφανές ότι το μέλλον ανήκει πλέον στις μαζικές μεθόδους.^{[5.1] [5.4] [5.5]}

Εφαρμογές και ηθικά ερωτήματα

Η δυνατότητα να μπορούμε να χαρτογραφήσουμε οικονομικά και γρήγορα ολόκληρο το γονιδίωμα ενός ανθρώπου προσφέρει απεριόριστες εφαρμογές και μπορεί να επηρεάσει διάφορες πτυχές της ζωής ενός ατόμου. Για αυτό το λόγο είναι πολύ σημαντικό να γνωρίζει κανείς πως μπορεί να τον ωφελήσει αλλά και πως μπορεί να τον βλάψει η γνώση που βρίσκεται συμπυκνωμένη στα κύτταρά μας.

Σε ότι αναφορά τις δυνατές εφαρμογές, η αποκωδικοποίηση του DNA σχετίζεται κυρίως με την ανάπτυξη μιας φιλοσοφίας «ατομικής» περίθαλψης. Στο μέλλον θα είναι πολύ εύκολο να εντοπιστούν γενετικές και κληρονομικές ασθένειες. Αντίστοιχα μπορεί να αναπτυχθούν και γενετικές θεραπείες που θα στοχεύουν στην ενίσχυση της έκφρασης ή την φίμωση συγκεκριμένων γονιδίων. Γενετικά μεταλλαγμένα φυτά και ζώα, που είδη αναπτύσσονται, θα είναι ευκολότερο να αναπτυχθούν και να διαδοθούν.

Επίσης, μελετώντας το γενετικό υλικό διαφόρων οργανισμών αναμένεται να μάθουμε πολλά για την εξέλιξη των ειδών στον πλανήτη. Ακόμα, από το γενετικό υλικό διαφόρων λαών θα μπορέσουμε να εντοπίσουμε την πορεία των προγόνων μας στην κατάκτηση του πλανήτη.

Άλλες εφαρμογές μπορεί να μην σχετίζονται άμεσα με την υγεία και τη γενετική. Η αστυνομία χρησιμοποιεί είδη ελέγχους DNA για να ταυτοποιήσει αδιάψευστα πρόσωπα με βάση το γενετικό τους υλικό. Είναι επίσης γνωστό ότι έχουν βρεθεί γονίδια που σχετίζονται με την επιθετικότητα, αλλά και με την καλλιτεχνική κλίση ενός ατόμου. Κάποια άλλα γονίδια μπορεί να σχετίζονται με την ροπή ενός ατόμου στον αθλητισμό και με τις δυνατότητες του.

Ήδη, απλώς καταγράφοντας τις δυνατές εφαρμογές, εγείρονται στον καθένα ηθικά ερωτήματα. Η αποκρυπτογράφηση του DNA μπορεί να παρέχει μεγάλη γνώση αλλά η διαχείριση της γνώσης αυτής είναι σημαντικό να γίνει σωστά ώστε να προστατευθεί η ελευθερία του ατόμου.

Το πρώτο ερώτημα που εγείρεται έχει να κάνει με τη διάγνωση της πιθανότητας να εκδηλώσει το άτομο κάποια σοβαρή ασθένεια. Σε ποιες περιπτώσεις θα πρέπει ο ασθενής να ενημερώνεται; Προφανώς κατανοεί κανείς τη διαφορετικές επιπλοκές που παρουσιάζονται ανάλογα με το αν η ασθένεια είναι αντιμετωπίσιμη, θανατηφόρα ή κληρονομική.

Επίσης ένα άλλο ερώτημα έχει να κάνει με την πρόσβαση στα δεδομένα που θα παράγονται. Ποιος θα μπορεί να έχει πρόσβαση σε αυτά; Ο ασθενής; Οποιοσδήποτε γιατρός; Οι συγγενείς; Η αστυνομία; Ασφαλιστικές εταιρίες; Εργοδότες; Αθλητικοί σύλλογοι; Καταλαβαίνει κανείς ότι θα πρέπει να δημιουργηθεί νέα νομοθεσία που να αφορά την παραγωγή, την πρόσβαση και την αποθήκευση των γενετικών δεδομένων καθώς δεν υπάρχουν δεδομένα παρόμοιας σημασίας και αξίας μέχρι σήμερα.

Ένα άλλο ερώτημα έχει σχέση με την καταγραφή ολόκληρου του γονιδιώματος ή μέρος αυτού. Εφόσον οι ερευνητές γνωρίζουν συγκεκριμένα παθογόνα γονίδια θα πρέπει να ελέγχουν μόνο αυτά ή θα μπορεί να ζητήσει κανείς την πλήρη καταγραφή του γονιδιώματος του προληπτικά, ούτως ώστε αν βρεθούν νέα παθογόνα γονίδια να γίνει ανίχνευση και για αυτά;

Τέλος μπορεί το κάθε άτομο να ζητήσει και να λάβει την πλήρη χαρτογράφηση του γονιδιώματός του, ή και ενός άλλου ατόμου όπως π.χ. του παιδιού. Τι συνέπειες μπορεί να έχει αυτό στην ψυχική υγεία του καθενός; Ακόμα μπορεί κάποτε να επιλέγουμε το σύντροφο μας με βάση το γενετικό του υλικό; Ποιες θα είναι οι συνέπειες για τα παιδιά που θα γνωρίζουν ότι έχουν γεννηθεί με κάποια ασθένεια ή και μια συγκεκριμένη κλήση.

Όλα αυτά τα ερωτήματα μπορεί να μοιάζουν με επιστημονική φαντασία ακόμα, αλλά δεδομένης της ταχύτατης εξέλιξης της γενετικής δεν θα αργήσει η στιγμή που η ανθρωπότητα θα πρέπει να δώσει απαντήσεις. Μέχρι τότε θα πρέπει να υπάρχει λοιπόν μια ισχυρή νομοθεσία καθώς και να τεθούν τεχνολογικοί περιορισμοί, έτσι ώστε να προφυλαχθούν τα δικαιώματα του ανθρώπου και να εμποδιστεί η κατάχρηση των δεδομένων.

Ολοκληρώνοντας τη σκέψη αυτή, είναι πολύ σημαντικό για τον καθένα να σκεφτεί πόσο μεγάλη δύναμη έχει η γνώση και η πληροφορία. Έτσι είναι πολύ πρέπει να μπορεί να προστατέψει κανείς τις πολύτιμες πληροφορίες, μιας και η ανάσχεση της εξέλιξης της τεχνολογίας και της ανακάλυψης νέων γνώσεων είναι αδύνατη

Όπως είδαμε τα γονίδια περιέχουν συμπυκνωμένη όλη την πληροφορία που απαιτείται για τη λειτουργία ενός οργανισμού. Από την άλλη πλευρά οι τελικοί εκφραστές, που θέτουν σε εφαρμογή τις διάφορες εντολές, είναι οι πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες είναι υπεύθυνες για την εκτέλεση κάθε λειτουργίας καθώς και για τις φυσικές ιδιότητες, την εμφάνιση και το σχήμα κάθε μικροσκοπικού ή μεγάλου χαρακτηριστικού ενός οργανισμού. Επομένως, αν μπορέσουμε να βρούμε πως επηρεάζεται η παραγωγή και διακίνηση των πρωτεϊνών, αλλά και ποιες πρωτεΐνες είναι υπεύθυνες για ποια χαρακτηριστικά, θα μπορέσουμε να προβλέψουμε και να καθορίσουμε σε μεγάλο βαθμό τη λειτουργία ενός οργανισμού.

Φυσικά, το να μετρήσουμε όλες τις πρωτεΐνες, σε όλα τα δυνατά σχήματα και όλους τους δυνατούς συνδυασμούς πρωτεϊνών την κάθε χρονική στιγμή, όπως μπορούμε να μετρήσουμε το συνολικό γονιδίωμα ενός ατόμου, είναι απλά αδύνατο. Οι πρωτεΐνες δεν καθορίζονται απλά από την ακολουθία των αμινοξέων από τα οποία αποτελούνται. Η δομή και το σχήμα τους, που δεν είναι απαραίτητως σταθερά στο χρόνο και καθορίζονται από διάφορους εξωτερικούς παράγοντες, όπως το χημικό περιβάλλον, η θερμοκρασία κ.λπ., παίζουν καθοριστικό ρόλο στη λειτουργία διαφόρων πρωτεϊνών. Επίσης, σύνθεση διαφόρων πρωτεϊνών μεταξύ του μπορεί να δημιουργήσει πρωτεΐνες με διαφορετικές ιδιότητες. Με τον τρόπο αυτό δημιουργούνται άπειροι συνδυασμοί από τους οποίους προκύπτει και η μεγάλη ποικιλία στον φαινότυπο των έμβιων οργανισμών.

Ένα ακόμα μεγάλο ζήτημα με τη μέτρηση πρωτεϊνών είναι ότι κάθε φορά μπορούμε να μετράμε μόνο μια συγκεκριμένη δομή μιας πρωτεΐνης και δεν μπορούμε να μετρήσουμε ταυτόχρονα ακόμα και το ίδιο είδος πρωτεΐνης, αν έχει παρεμβληθεί κάποιος μετασχηματισμός. Επιπλέον, κάποιες πρωτεΐνες βρίσκονται σε μεγάλη πληθώρα στα κύτταρα, ενώ άλλες σε απειροελάχιστες ποσότητες, κάνοντας πολύ δύσκολο τον εντοπισμό των δευτέρων. Τέλος, ένα άλλο πρόβλημα στη μέτρηση των πρωτεϊνών είναι ότι δεν μπορούμε να τις αναπαράγουμε στο εργαστήριο όπως κάνουμε με το DNA και έτσι δεν μπορούμε να ενισχύσουμε το σήμα ενός δείγματος.

Στη συνέχεια θα προχωρήσουμε στην παρουσίαση ορισμένων μόνο μεθόδων που χρησιμοποιούνται για την μέτρηση πρωτεϊνών. Όπως και στην περίπτωση της μέτρησης του DNA, οι μέθοδοι αυτές χωρίζονται σε μαζικές και μη μαζικές, ανάλογα με το αν μπορεί να γίνει παράλληλη επεξεργασία μεγάλου αριθμού δειγμάτων. Μια άλλη διάκριση που θα μας απασχολήσει περισσότερο στο σημείο αυτό είναι με βάση το αν ξεκινώντας τη μέτρηση γνωρίζουμε ποιες πρωτεΐνες θα μετρήσουμε ή όχι.

Αρχικά θα προχωρήσουμε στην συνοπτική παρουσίαση των μεθόδων όπου δεν μετράμε συγκεκριμένες πρωτεΐνες, αλλά προσπαθούμε να μετρήσουμε όσο το δυνατόν το συνολικό σώμα των πρωτεϊνών σε ένα δείγμα. Στις μεθόδους αυτές θέλουμε να μετρήσουμε όσο το δυνατόν περισσότερα, αλλά μπορούμε να επεξεργαστούμε παράλληλα πολύ μικρό αριθμό δειγμάτων. Για το λόγο αυτό, οι μέθοδοι αυτές είναι γενικά μη μαζικές μέθοδοι.

Στη συνέχεια θα παρουσιάσουμε συνοπτικά και τις μεθόδους στις οποίες θέλουμε να μετρήσουμε την ύπαρξη συγκεκριμένων πρωτεϊνών στο δείγμα. Στην περίπτωση αυτή είναι περιορισμένος ο αριθμός των πρωτεϊνών, την ύπαρξη των οποίων μπορούμε να μετρήσουμε κάθε φορά, αλλά είναι πολλά τα δείγματα που μπορούμε να επεξεργαστούμε παράλληλα. Έτσι οι μέθοδοι αυτές είναι γενικά μαζικές (high-throughput).

Μέτρηση άγνωστων πρωτεϊνών (μη μαζικές μέθοδοι)

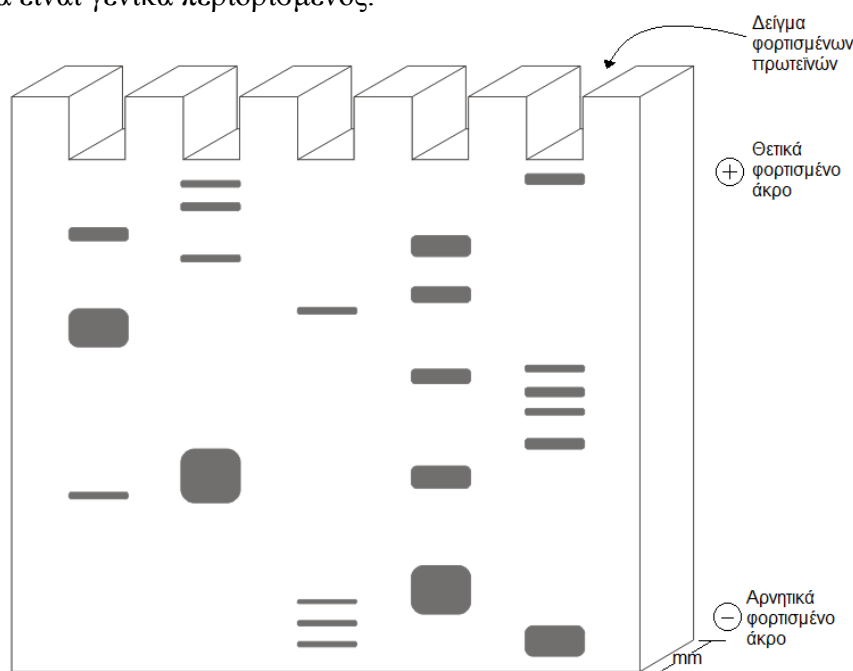
Στις μεθόδους αυτές χρησιμοποιούμε κάποιες εκ των προτέρων γνωστές ιδιότητες των πρωτεϊνών, όπως είναι η μάζα και το ηλεκτρικό φορτίο τους. Οι μέθοδοι αυτές είναι γενικά ποιοτικές και έχουν χαμηλή ακρίβεια. Χρησιμοποιούνται κυρίως για να βρεθούν μεγάλες διαφορές στην παράγωγη πρωτεϊνών ανάμεσα σε υγιή και ασθενή κύτταρα. Στη συνέχεια παρουσιάζουμε συνοπτικά ορισμένες από αυτές τις μεθόδους.

➤ Western blot

Η μέθοδος αυτή κυριάρχησε για πολλά χρόνια στο χώρο της μέτρησης πρωτεϊνών. Είναι σχετικά απλή μέθοδος, αλλά είναι γενικά δύσκολο να αυτοματοποιηθεί, ενώ τα αποτελέσματα που δίνει είναι κυρίως ποιοτικά. Επίσης, σε σχέση με τις μαζικές μεθόδους που θα εξετάσουμε στη συνέχεια είναι και αρκετά χρονοβόρα. Πάνω στη μέθοδο αυτή έχουν βασιστεί και οι υπόλοιπες μη μαζικές μέθοδοι, αναπτύσσοντας κατά καιρούς διάφορες παραλλαγές της.

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί μια διαδικασία που ονομάζεται ηλεκτροφόρηση γέλης (gel electrophoresis) για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών του δείγματος. Γενικά ο διαχωρισμός μπορεί να γίνει ανάλογα με τις ηλεκτρικές ιδιότητες μιας πρωτεΐνης, το μοριακό της βάρος ή συνδυασμό παραγόντων.

Η διαδικασία για την μέτρηση πρωτεϊνών σε western blot έχει ως εξής: Εφαρμόζουμε διαφορά δυναμικού σε σώμα γέλης όπου έχουμε τοποθετήσει και το δείγμα των ηλεκτρικά φορτισμένων πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες κινούνται προς τα κάτω μέσα στη γέλη με ταχύτητα που εξαρτάται από τη μάζα τους. Αν εμείς γνωρίζουμε τις μάζες διαφόρων πρωτεϊνών μπορούμε ανάλογα με το βάθος όπου έφτασε το δείγμα στη γέλη να τις ταυτοποιήσουμε. Έτσι αναγνωρίζουμε πρωτεΐνες με περίπου γνωστό μέγεθος, ενώ υπολογίζουμε ποιοτικά από το αποτύπωμα που δημιουργείται και την ποσότητά τους. Τα αποτελέσματα αποτυπώνονται σε διαφανές χαρτί που ακουμπάμε πάνω στη γέλη. Ο αριθμός των δειγμάτων που μπορούμε να διαχειριστούμε παράλληλα είναι γενικά περιορισμένος.



Εικόνα 5.4: Μέθοδος Western blot

➤ 2D Page

Η μέθοδος αυτή είναι εντελώς παρόμοια με την προηγούμενη, μόνο που στην περίπτωση αυτή έχουμε μόνο ένα δείγμα για το οποίο μπορούμε να μετρήσουμε παράλληλα δύο ιδιότητες. Στην μια διεύθυνση κίνησης του δείγματος μπορούμε για παράδειγμα να μετράμε τη μάζα των πρωτεϊνών και στην άλλη διεύθυνση το ηλεκτρικό τους φορτίο.

➤ Φασματοσκοπία μάζας (Mass spectrometry - MS)

Η φασματοσκοπία μάζας είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρέως για τον προσδιορισμό της μάζας σωματιδίων σε ένα μίγμα ή μόριο. Το δείγμα ιοντίζεται και στη συνέχεια μπαίνει σε ένα σωλήνα όπου εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο. Οι πρωτεΐνες του δείγματος επιταχύνονται ανάλογα με τη μάζα τους και η συσκευή μετρά και αποδίδει το φάσμα των μαζών του δείγματος. Αντιστοιχίζοντας γνωστές μάζες σε πρωτεΐνες αναγνωρίζουμε τελικώς τη σύσταση του δείγματος. Η μέθοδος αυτή δεν αποδίδει ούτε καν ποιοτικά αποτελέσματα για την ποσότητα των διάφορων πρωτεϊνών.

Μέτρηση γνωστών πρωτεϊνών (μαζικές μέθοδοι)

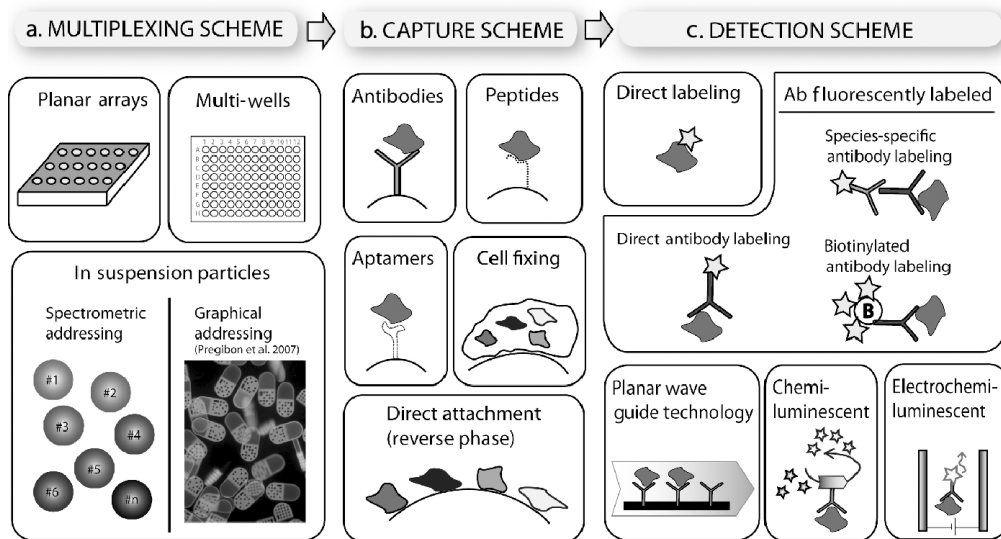
Στις μεθόδους αυτές μετράμε συγκεκριμένες πρωτεΐνες μέσα σε ένα δείγμα. Η μέτρηση των πρωτεϊνών αυτών γίνεται με χρήση συγκεκριμένων αντισωμάτων. Όπως είδαμε στο κεφάλαιο 2 όλες οι πρωτεΐνες έχουν κάποιες περιοχές σύνδεσης, όπου συνδέονται ισχυρά με άλλες πρωτεΐνες. Οι περιοχές αυτές είναι συγκεκριμένες για κάθε ζεύγος πρωτεϊνών. Το χαρακτηριστικό αυτό εκμεταλλευόμαστε και παράγουμε αντισώματα που συνδέονται αποκλειστικά και μόνο με συγκεκριμένες πρωτεΐνες. Επειδή οι μέθοδοι αυτές βασίζονται σε αυτή την ιδιότητα ονομάζονται και «μέθοδοι βασισμένες συνάφεια» (affinity based methods).

Η συνάφεια, δηλαδή το πόσο ισχυρός είναι ο δεσμός, μεταξύ του αντισώματος και της εν λόγω πρωτεΐνης είναι κρίσιμης σημασίας για τις μεθόδους αυτές. Για το λόγο αυτό έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνολογίες που παρέχουν μεγαλύτερη ή μικρότερη ακρίβεια μετρήσεων ανάλογα με τα αντισώματα τα οποία χρησιμοποιούν. Σε κάθε περίπτωση, μόνο οι μέθοδοι αυτές δίνουν τη δυνατότητα να μετρήσουμε ακόμα και πρωτεΐνες που βρίσκονται σε πολύ μικρή ποσότητα στο δείγμα, πράγμα αδύνατο για τις μεθόδους που αναλύσαμε μέχρι τώρα.

Υπάρχουν τρία βασικά χαρακτηριστικά τα οποία ικανοποιεί κάθε μέθοδος που βασίζεται στη συνάφεια:

1. Ένας τρόπος αναγνώρισης (identification or multiplexing scheme) είναι απαραίτητος για να μπορεί να διαχειριστεί κανείς ταυτόχρονα πολλά δείγματα και να τα ξεχωρίσει από το σύνολο κατά τη μέτρηση. Το χαρακτηριστικό αυτό επιτυγχάνεται χωρίζοντας το δείγμα σε διαφορετικά πηγαδάκια (wells), σε διαφορετικά σημεία σε μια γυάλινη πλάκα ή επάνω σε μικροσφαιρίδια με διαφορετικές ιδιότητες.
2. Ένας τρόπος σύνδεσης (capture scheme) που σκοπό έχει να ακινητοποιήσει τις πρωτεΐνες που θέλουμε να μετρήσουμε στα σημεία αναγνώρισης που περιγράψαμε παραπάνω. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται κυρίως τα επιλεγμένα αντισώματα, αλλά και άλλες μέθοδοι.

3. Ένας τρόπος αναγνώρισης (detection scheme) που ιδανικά μπορεί να μετρήσει μια ιδιότητα που είναι ανάλογη της ποσότητας της εκάστοτε πρωτεΐνης στο δείγμα.

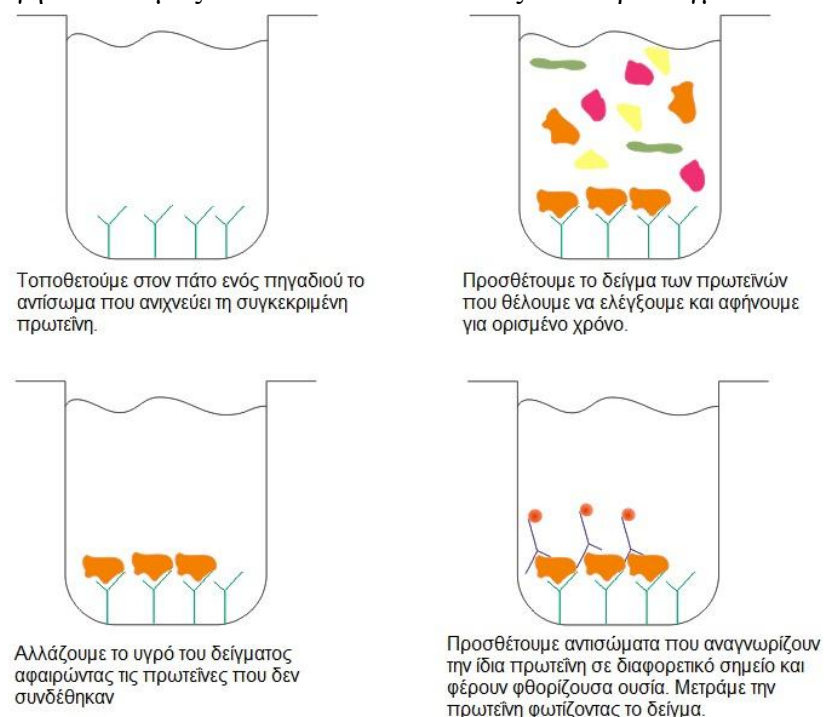


Εικόνα 5.5: Βασικά χαρακτηριστικά μεθόδων συνάφειας^[5.6]

Στη συνέχεια θα προχωρήσουμε στη συνοπτική παρουσίαση ορισμένων μεθόδων αυτής της κατηγορίας. Οι μέθοδοι αυτές με τη σειρά τους μπορεί να έχουν διάφορες παραλλαγές αλλά εμείς θα περιοριστούμε σε μια συνοπτική και γενική παρουσίαση.

– ELISA

Η μέθοδος αυτή είναι μια από τις πιο διαδεδομένες ενώ έχει και πολλές παραλλαγές. Το όνομά της προέρχεται από το ακρωνύμιο Enzyme Linked Immunosorbent Assay. Στη συνέχεια θα περιγράψουμε σχηματικά μια παραλλαγή που ονομάζεται sandwich ELISA ως ένα παράδειγμα.



Εικόνα 5.6: Μέθοδος ELISA

– Protein Microarrays

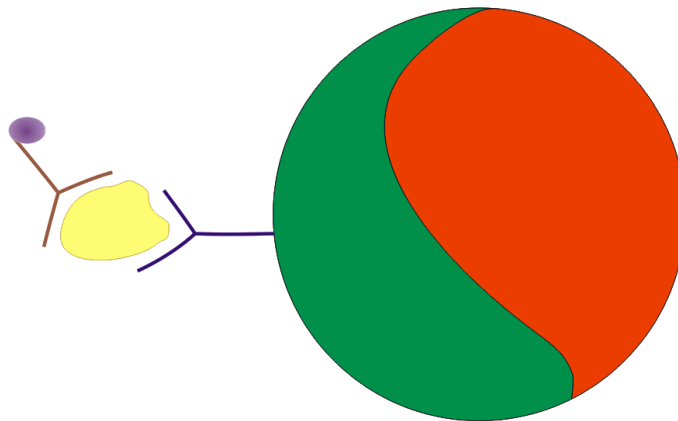
Η μέθοδος αυτή μοιάζει πολύ με τη μέθοδο ELISA με την μόνη διαφορά ότι το αρχικό αντίσωμα δεν στερεώνεται σε ξεχωριστά πηγαδάκια αλλά πάνω ε μια γυάλινη πλάκα. Με τον τρόπο αυτό μπορούμε να μετρήσουμε μεγάλες ποσότητες δείγματος, αν και υπάρχουν περιορισμοί ως προς την ακρίβεια της μεθόδου. Η στοίχιση του δείγματος στην πλάκα μπορεί να έχει κάποιο πρόσθετο νόημα και να έχει προκύψει για παράδειγμα με τη μέθοδο 2D.

– Meso-Scale Discovery (MSD)

Η μέθοδος αυτή είναι παρόμοια με τη μέθοδο ELISA και διαφέρει στον τρόπο που γίνεται η αναγνώριση των αντισωμάτων. Λόγω αυτής της διαφορετικής διαδικασίας μπορούν να τοποθετηθούν σε κάθε πηγαδάκι μέχρι 10 διαφορετικά αντισώματα, τα οποία θα αναγνωρίσουν 10 διαφορετικές πρωτεΐνες και μάλιστα με μεγάλη ακρίβεια. Το μειονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ότι απαιτεί συγκεκριμένα αναλώσιμα που παρέχονται μόνο από συγκεκριμένες εταιρίες.

– xMap Technology

Η τεχνολογία αυτή, που είναι προϊόν της εταιρείας Luminex Corporation, έχει ένα ιδιαίτερο πλεονέκτημα σε σχέση με όλες τις άλλες μεθόδους. Χρησιμοποιεί μικροσφαιρίδια (beads) διαμέτρου της τάξης των μερικών μμ πάνω στα οποία τοποθετούνται τα αντισώματα που προσδένουν τις πρωτεΐνες. Τα μικροσφαιρίδια αυτά είναι από πολυμερή υλικά και περιέχουν, σε διάφορα ποσοστά φθορίζουσες ουσίες, δίνοντας έτσι τη δυνατότητα ανίχνευσης 100 διαφορετικών χρωμάτων. Επομένως, σε κάθε δείγμα θα μπορούσαν να μετρηθούν 100 διαφορετικές πρωτεΐνες, αν και αυτό δεν είναι πρακτικά επιτεύξιμο λόγω άλλων περιορισμών. Τα μικροσφαιρίδια προστίθενται στο δείγμα και το κάθε σφαιρίδιο δρα σαν ένα ξεχωριστό πηγαδάκι της μεθόδου ELISA. Στη συνέχεια τα σφαιρίδια με τις πρωτεΐνες που έχουν προσδεθεί περνάν από ένα ανιχνευτή laser όπου εντοπίζεται το χρώμα του σφαιριδίου, άρα ο τύπος της πρωτεΐνης που έχει προσδεθεί, και ο φθορισμός του δεύτερου αντισώματος που αποδεικνύει ότι πράγματι το σφαιρίδιο φέρει την πρωτεΐνη. Μετρώντας τον αριθμό των αριθμό των σφαιριδίων κάθε χρώματος έχουμε και μια εικόνα για την ποσότητα της πρωτεΐνης. Μια παραλλαγή της μεθόδου αυτής χρησιμοποιεί μαγνητικά μικροσφαιρίδια που διευκολύνουν την επεξεργασία του δείγματος και αυξάνουν την ταχύτητα της διαδικασίας.

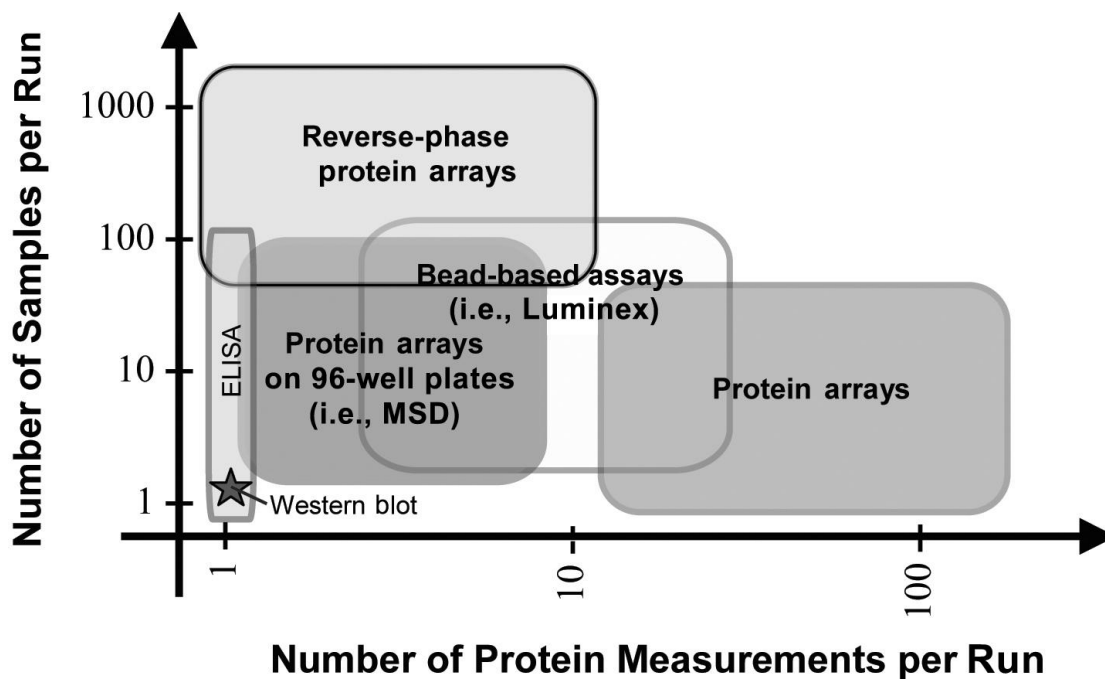


Εικόνα 5.7: Μικροσφαιρίδιο

– Reverse Phase

Η μέθοδος αυτή, όπως και η προηγούμενες, χρησιμοποιεί αντισώματα για την ανίχνευση των πρωτεϊνών, μόνο που στην περίπτωση αυτή απαιτείται μόνο ένα αντίσωμα. Το δείγμα προσκολλάται απευθείας σε μια πλάκα ή μεμβράνη και στη συνέχεια μπορεί να χρησιμοποιηθούν διάφορες μέθοδοι για την ανίχνευση των πρωτεϊνών. Μπορεί να χρησιμοποιηθούν διαφορετικά δευτερεύοντα αντισώματα σε διαφορετικά βήματα της διαδικασίας και να μετρηθούν με τον τρόπο αυτό πολλές πρωτεΐνες χωρίς να μειώνεται η ισχύς του δείγματος. Τα μειονεκτήματα του σχετίζονται με την πιθανότητα να μετράμε δευτερεύοντα αντισώματα που όμως δεν έχουν προσδεθεί σε κάποια πρωτεΐνη.

Έχοντας αναλύσει τις πιο διαδεδομένες από τις μεθόδους μέτρησης πρωτεϊνών προχωράμε σε μια σχηματική σύγκρισή τους. Γενικά δεν υπάρχει αμφιβολία ότι οι μαζικές μέθοδοι σύντομα θα βελτιωθούν και θα κυριαρχήσουν, δίνοντας όλο και μεγαλύτερες δυνατότητες στο πεδίο της μέτρησης πρωτεϊνών (proteomics).^{[5.1][5.6]}



Εικόνα 5.8: Σύγκριση μεθόδων^[5.6]

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [5.1] <http://en.wikipedia.org/wiki/>
- [5.2] <http://www.economist.com/node/16349358>, Περιοδικό “The Economist” από το άρθρο της τυπωμένης έκδοσης 17 Ιουνίου 2010.
- [5.3] <http://genomics.xprize.org/competition-details/prize-overview>
- [5.4] Next-generation sequencing transforms today’s biology, S. C. Schuster, Nature Methods, 2008, Vol.5 No.1, p.16.
- [5.5] Massively Parallel Sequencing: The Next Big Thing in Genetic Medicine, T. Tucker M. Marra J. M. Friedman, The American Journal of Human Genetics, 2009, Vol. 85, p. 142–154.
- [5.6] Drug efficacy, safety and biologics discovery-Emerging technologies and tools, S. Ekins J. J. Xu, Wiley, 2009, Κεφάλαιο 2.